

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

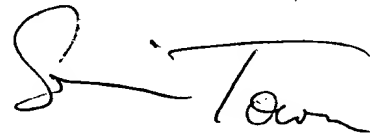
**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

DECLARATION

I, Sabine Frieda Katharina Town, declare that I am a citizen of the Federal Republic of Germany, residing at Waldstraße 45, 82386 Oberhausen, Federal Republic of Germany, that I am fluent in German and English, that I am a competent translator from German into English and that the attached is a true and accurate translation made by me into the English language of International Patent Application No. PCT/EP99/06321 dated 27.08.1999.

I further declare that all statements made herein of my knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that wilful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such wilful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issuing thereon.

I hereby subscribe my name to the foregoing declaration, this thirteenth day of February 2001.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'S. Town' with a stylized flourish.

Sabine F.K. Town

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C. 20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing: 09 March 2000 (09.03.00)	
International application No.: PCT/EP99/06321	Applicant's or agent's file reference: 4966/00/WO
International filing date: 27 August 1999 (27.08.99)	Priority date: 01 September 1998 (01.09.98)
Applicant: ENDL, Josef et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:

02 February 2000 (02.02.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer: J. Zahra Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTENS

 Roche Diagnostics GmbH
 Patent Dept. (TR-E) Parizberg

21. NOV. 2000

 Absender: MIT DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
 PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

An:

 ROCHE DIAGNOSTICS GMBH
 Patentabteilung
 D-68298 Mannheim
 ALLEMAGNE

R	Roche Diagnostics GmbH	AB
JG	Patentabteilung	HIL
SI	15. Nov. 2000	WN
Kn	Enl.	RA
P	KO KIL S SL IM WB	

 MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERSENDUNG
 DES INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
 PRÜFUNGSBERICHTS
 (Regel 71.1 PCT)

 Absendedatum
 (Tag/Monat/Jahr)

15.11.2000

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts

4966/00/WO-LIA

WICHTIGE MITTEILUNG

 Internationales Aktenzeichen
 PCT/EP99/06321

 Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)
 27/08/1999

 Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)
 01/09/1998

Anmelder

ROCHE DIAGNOSTICS GMBH et al.

 1. Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß ihm die mit der internatio
 hiermit den zu der internationalen Anmeldung erstellten inter
 gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen, übermittelt

 2. Eine Kopie des Berichts wird - gegebenenfalls mit den dazu
 Weiterleitung an alle ausgewählten Ämter übermittelt.

 3. Auf Wunsch eines ausgewählten Amtes wird das Internationa
 nicht der Anlagen) ins Englische anfertigen und diesem Amt

4. ERINNERUNG

Zum Eintritt in die nationale Phase hat der Anmelder vor jedem ausgewählten Amt innerhalb von 30 Monaten ab dem Prioritätsdatum (oder in manchen Ämtern noch später) bestimmte Handlungen (Einreichung von Übersetzungen und Entrichtung nationaler Gebühren) vorzunehmen (Artikel 39 (1)) (siehe auch die durch das Internationale Büro im Formblatt PCT/IB/301 übermittelte Information).

Ist einem ausgewählten Amt eine Übersetzung der internationalen Anmeldung zu übermitteln, so muß diese Übersetzung auch Übersetzungen aller Anlagen zum internationalen vorläufigen Prüfungsbericht enthalten. Es ist Aufgabe des Anmelders, solche Übersetzungen anzufertigen und den betroffenen ausgewählten Ämtern direkt zuzuleiten.

Weitere Einzelheiten zu den maßgebenden Fristen und Erfordernissen der ausgewählten Ämter sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

 Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung
 beauftragten Behörde

 Europäisches Patentamt
 D-80298 München
 Tel. +49 89 23999-0 Tx: 523656 epmu d
 Fax: +49 89 23999-4466

Bevollmächtigter Bediensteter

Danti, B

Tel. +49 89 23999-8161





VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE AMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 4966/00/WO	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/06321	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 27/08/1999	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 01/09/1998
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C07K18/18		
Anmelder ROCHE DIAGNOSTICS GMBH et al.		
<p>1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.</p> <p>2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).</p> <p>Diese Anlagen umfassen insgesamt 3 Blätter.</p>		
<p>3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:</p> <ul style="list-style-type: none"> I <input checked="" type="checkbox"/> Grundlage des Berichts II <input type="checkbox"/> Priorität III <input type="checkbox"/> Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit IV <input type="checkbox"/> Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung V <input checked="" type="checkbox"/> Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit: Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung VI <input type="checkbox"/> Bestimmte angeführte Unterlagen VII <input checked="" type="checkbox"/> Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung VIII <input checked="" type="checkbox"/> Bestimmte Bemerkungen zur Internationalen Anmeldung 		
Datum der Einreichung des Antrags 02/02/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 15.11.2000	
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80299 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465		Bevollmächtigter Bediensteter Goetz, M Tel. Nr. +49 89 2399 8697 

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/06321

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-19 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-14 eingegangen am 21/10/2000 mit Schreiben vom 20/10/2000

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen Behörde in der Sprache: , zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, dass das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, dass die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/06321

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche 1 - 14
	Nein: Ansprüche
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche 1 - 14
	Nein: Ansprüche
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche 1 - 14
	Nein: Ansprüche

2. Unterlagen und Erklärungen siehe Beiblatt

VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:
siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
siehe Beiblatt

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT - BEIBLATT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/06321

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Die folgenden Dokumente werden als relevant erachtet:

D1: EP-A-0 499 176 (Boehringer Mannheim GmbH), 19. August 1992

D2: SOLIMENA et al., EMBO J. 15/9, 1. Mai 1996 (1996-05-01), S. 2102-2114

- 1.1. **D1** offenbart die technischen Massnahmen zur Bereitstellung humaner Autoantikörper gegen Inselzellenantigene. Weiters sind aus **D2** die autoantigenen Eigenschaften von IA-2 (auch ICA 512) bekannt.
2. Die neu eingereichten Ansprüche 1 - 14 beziehen jedoch sich auf einen gegen das Inselzellenantigen IA-2 gerichteten Antikörper, zu dessen Bereitstellung eine Reihe von **besonderen technischen Massnahmen zur Überwindung unvorhergesehener Schwierigkeiten** ergriffen wurden (Seite 6/Zeile 4 - Seite 8/Zeile 27), die weder in **D1** noch **D2** offenbart wurden; daher ist der jeweilige Gegenstand der Ansprüche 1 - 14, die sich auf durch das genannte Bereitstellungsverfahren erhaltenen monoklonalen Antikörper, die derart erzeugte spezielle Zelllinie A-2, 96-3-1 mit der Hinterlegungsnummer DSM ACC2365, oder den daraus isolierten monoklonalen humanen Antikörper beziehen, neu (Art. 33(2) PCT) und beruht auf erfinderischer Tätigkeit (Art. 33(3) PCT).
3. Der Gegenstand des Anspruchs 6 ist insofern ausreichend klar (Art. 6 PCT), als aus Seite 9/Zeilen 4 - 18 ersichtlich ist, wie der Fachmann feststellen kann, ob ein bestimmter vorliegender anti-IA-2 Antikörper unter den Begriff "*... in äquivalenter Weise bindefähig ...*" fällt.

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT - BEIBLATT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/06321

Zu Punkt VII

Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Die Beschreibung steht nicht, wie in Regel 5.1 a) iii) PCT vorgeschrieben, in Einklang mit dem Wortlaut der **geänderten Ansprüche**.

Zu Punkt VIII

Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Der nunmehr gültige Anspruch 1 entspricht dem ursprünglich eingereichten Anspruch 3; durch dessen Rückbezug auf den ursprünglich eingereichten Anspruch 1 war darin auch das Merkmal "... die spezifisch mit dem Inselzellenantigen IA-2 reagieren ..." enthalten; dieses Merkmal fehlt nun im geänderten Anspruch 1, wodurch letzterer formal unklar wird (Art. 6 PCT), da nicht eindeutig ersichtlich ist, gegen welches Antigen der beanspruchte monoklonale Antikörper gerichtet ist.

21-10-2000

EP 009906321

Patentansprüche

1. Humane monoklonale Antikörper, erhältlich durch die Verfahrensschritte
Immortalisieren von humanen Lymphozyten von Prädiabetikern oder Diabetikern
5 mit hohen Serumantikörper-Titern gegen IA-2, Kultivierung der immortalisierten
Lymphozyten mit Wachstumsfaktoren unter gleichzeitiger Entfernung von
inhibitorischen Faktoren, Nachweis der IA-2-spezifischen humanen monoklonalen
Antikörper im Kulturüberstand, Klonierung der humanen immortalisierten Zelllinie,
die diesen Antikörper produziert, in Anwesenheit von Feederzellen, die keine
10 cytotoxischen T-Lymphozyten enthalten, Vermehrung dieser immortalisierten Zelle
gegebenenfalls unter Zusatz von Wachstumsfaktoren und Isolierung des von diesem
Klon produzierten monoklonalen Antikörpers.
2. Humane monoklonale Antikörper gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß
15 sie spezifisch mit IA-2ic, dem cytoplasmatischen Teil von IA-2 reagieren.
3. Humane monoklonale Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 2, dadurch
gekennzeichnet, daß sie der Klasse IgG angehören.
- 20 4. Humane monoklonale Antikörper nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß
sie der Subklasse IgG1 angehören.
5. Humane monoklonale Antikörper nach den Ansprüchen 1 bis 4, erhältlich aus der
Zelllinie IA-2, 96-3-1 mit der Hinterlegungsnummer DSM ACC2365.
25
6. Humane monoklonale Antikörper nach den Ansprüchen 1 bis 5, die in äquivalenter
Weise mit IA-2 bindefähig sind wie die Antikörper, die von der Zelllinie IA-2, 96-3-
1, Hinterlegungsnummer DSM ACC2365, produziert werden.
- 30 7. Zelllinie IA-2, 96-3-1 mit der Hinterlegungsnummer DSM ACC2365.

21-10-2000

EP 009906321

2

8. Verfahren zur Herstellung von humanen monoklonalen Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 6 enthaltend die Schritte Immortalisieren von humanen Lymphozy-
5 ten von Prädiabetikern oder Diabetikern mit hohen Serumantikörper-Titern gegen IA-2, Kultivierung der immortalisierten Lymphozyten mit Wachstumsfaktoren unter gleichzeitiger Entfernung von inhibitorischen Faktoren, Nachweis der IA-2-spezifischen humanen monoklonalen Antikörper im Kulturüberstand, Klonierung der humanen immortalisierten Zelllinie, die diesen Antikörper produziert, in Anwesenheit
10 von Feederzellen, die keine cytotoxischen T-Lymphozyten enthalten, Vermehrung dieser immortalisierten Zelle gegebenenfalls unter Zusatz von Wachstumsfaktoren, und Isolierung des von diesem Klon produzierten monoklonalen Antikörpers.
9. Verwendung eines humanen monoklonalen Antikörpers nach einem der Ansprüche
15 1 bis 6 als Standard in einem Verfahren zur Bestimmung von Antikörpern gegen ein Inselzellantigen.
10. Verwendung eines humanen monoklonalen Antikörpers nach einem der Ansprüche
20 1 bis 6 als Rezeptor in einem Verfahren zur Bestimmung von Antikörpern gegen ein Inselzellantigen.
11. Verwendung eines humanen monoklonalen Antikörpers nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Gewinnung des Inselzellantigens IA-2.
- 25 12. Verfahren zum Nachweis von Antikörpern gegen das Inselzellantigen IA-2 in einer Probe, dadurch gekennzeichnet, daß als Standard ein monoklonaler Antikörper gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 eingesetzt wird.

30

21-10-2000

EP 009906321

3

13. Anti-idiotypischer Antikörper, der gegen Antikörper, die mit dem Inselzellantigen IA-2 reagieren, gerichtet ist, erhältlich durch die Immunisierung mit einem Antikörper gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, Immortalisierung der Milzzellen der immunisierten Tiere, Klonierung von solchen immortalisierten Zellen, die Antikörper produzieren, die an Antikörper gegen IA-2 binden und Isolierung der von diesen Klonen produzierten Antikörper nach bekannten Verfahren.
- 10 14. Verfahren zum Nachweis des Inselzellantigens IA-2 in einer Probe, dadurch gekennzeichnet, daß als Bindepartner mindestens ein monoklonaler Antikörper gemäß den Ansprüchen 1 bis 6 eingesetzt wird.

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

EINGEGANGEN

Absender: INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE

PCT

09. DEZ. 1999

En:

An

ROCHE DIAGNOSTICS GMBH
- Patentabteilung -
D-68298 Mannheim
GERMANY

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERMITTLUNG DES
INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHTS
ODER DER ERKLÄRUNG

(Regel 44.1 PCT)

08. Dez. 1999

Absenddatum
(Tag/Monat/Jahr)

03/12/1999

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts

4966/00/WO - WU

WEITERES VORGEHEN

siehe Punkte 1 und 4 unten

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/06321

Internationales Anmeldedatum

(Tag/Monat/Jahr)

27/08/1999

Anmelder

ROCHE DIAGNOSTICS GMBH et al.

1. ☒ Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß der internationale Recherchenbericht erstellt wurde und ihm hiermit übermittelt wird.

Einreichung von Änderungen und einer Erklärung nach Artikel 19:

Der Anmelder kann auf eigenen Wunsch die Ansprüche der internationalen Anmeldung ändern (siehe Regel 46):

Bis wann sind Änderungen einzureichen?

Die Frist zur Einreichung solcher Änderungen beträgt üblicherweise zwei Monate ab der Übermittlung des internationalen Recherchenberichts; weitere Einzelheiten sind den Anmerkungen auf dem Beiblatt zu entnehmen.

Wo sind Änderungen einzureichen?

Unmittelbar beim Internationalen Büro der WIPO, 34, CHEMIN des Colombettes, CH-1211 Genf 20,
Telefaxnr.: (41-22) 740.14.35

Nähere Hinweise sind den Anmerkungen auf dem Beiblatt zu entnehmen.

2. ☐ Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß kein internationaler Recherchenbericht erstellt wird und daß ihm hiermit die Erklärung nach Artikel 17(2)a übermittelt wird.

3. ☐ Hinsichtlich des Widerspruchs gegen die Entrichtung einer zusätzlichen Gebühr (zusätzlicher Gebühren) nach Regel 40.2 wird dem Anmelder mitgeteilt, daß

☐ der Widerspruch und die Entscheidung hierüber zusammen mit seinem Antrag auf Übermittlung des Wortlauts sowohl des Widerspruchs als auch der Entscheidung hierüber an die Bestimmungsbüro dem Internationalen Büro übermittelt worden sind.

☐ noch keine Entscheidung über den Widerspruch vorliegt; der Anmelder wird benachrichtigt, sobald eine Entscheidung getroffen wurde.

4. **Weiteres Vorgehen:** Der Anmelder wird auf folgendes aufmerksam gemacht:

Kurz nach Ablauf von **18 Monaten** seit dem Prioritätsdatum wird die internationale Anmeldung vom Internationalen Büro veröffentlicht. Will der Anmelder die Veröffentlichung verhindern oder auf einen späteren Zeitpunkt verschieben, so muß gemäß Regel 90^{bis} bzw. 90^{ter} 3 vor Abschluß der technischen Vorbereitungen für die internationale Veröffentlichung eine Erklärung über die Zurücknahme der internationalen Anmeldung oder des Prioritätsanspruchs beim Internationalen Büro eingehen.

Innerhalb von **19 Monaten** seit dem Prioritätsdatum ist ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung einzureichen, wenn der Anmelder den Eintritt in die nationale Phase bis zu 30 Monaten seit dem Prioritätsdatum (in manchen Ämtern sogar noch länger) verschieben möchte.

Innerhalb von **20 Monaten** seit dem Prioritätsdatum muß der Anmelder die für den Eintritt in die nationale Phase vorgeschriebenen Handlungen vor allen Bestimmungsbüro vornehmen, die nicht innerhalb von 19 Monaten seit dem Prioritätsdatum in der Anmeldung oder einer nachträglichen Auswahlklärung ausgewählt wurden oder nicht ausgewählt werden konnten, da für sie Kapitel II des Vertrages nicht verbindlich ist.

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde



Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Barbara Klaver

T: 03.02.2000

Diese Anmerkungen sollen grundlegende Hinweise zur Einreichung von Änderungen gemäß Artikel 19 geben. Diesen Anmerkungen liegen die Erfordernisse des Vertrags über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens (PCT), der Ausführungsordnung und der Verwaltungsrichtlinien zu diesem Vertrag zugrunde. Bei Abweichungen zwischen diesen Anmerkungen und obengenannten Texten sind letztere maßgebend. Nähere Einzelheiten sind dem PCT-Leitfaden für Anmelder, einer Veröffentlichung der WIPO, zu entnehmen.

Die in diesen Anmerkungen verwendeten Begriffe "Artikel", "Regel" und "Abschnitt" beziehen sich jeweils auf die Bestimmungen des PCT-Vertrags, der PCT-Ausführungsordnung bzw. der PCT-Verwaltungsrichtlinien.

HINWEISE ZU ÄNDERUNGEN GEMÄSS ARTIKEL 19

Nach Erhalt des internationalen Recherchenberichts hat der Anmelder die Möglichkeit, einmal die Ansprüche der internationalen Anmeldung zu ändern. Es ist jedoch zu betonen, daß, da alle Teile der internationalen Anmeldung (Ansprüche, Beschreibung und Zeichnungen) während des internationalen vorläufigen Prüfungsverfahrens geändert werden können, normalerweise keine Notwendigkeit besteht, Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 einzureichen, außer wenn der Anmelder z.B. zum Zwecke eines vorläufigen Schutzes die Veröffentlichung dieser Ansprüche wünscht oder ein anderer Grund für eine Änderung der Ansprüche vor ihrer internationalen Veröffentlichung vorliegt. Weiterhin ist zu beachten, daß ein vorläufiger Schutz nur in einigen Staaten erhältlich ist.

Welche Teile der internationalen Anmeldung können geändert werden?

Im Rahmen von Artikel 19 können nur die Ansprüche geändert werden.

In der internationalen Phase können die Ansprüche auch nach Artikel 34 vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde geändert (oder nochmals geändert) werden. Die Beschreibung und die Zeichnungen können nur nach Artikel 34 vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde geändert werden.

Beim Eintritt in die nationale Phase können alle Teile der internationalen Anmeldung nach Artikel 28 oder gegebenenfalls Artikel 41 geändert werden.

Bis wann sind Änderungen einzureichen?

Innerhalb von zwei Monaten ab der Übermittlung des internationalen Recherchenberichts oder innerhalb von sechzehn Monaten ab dem Prioritätsdatum, je nachdem, welche Frist später abläuft. Die Änderungen gelten jedoch als rechtzeitig eingereicht, wenn sie dem Internationalen Büro nach Ablauf der maßgebenden Frist, aber noch vor Abschluß der technischen Vorbereitungen für die internationale Veröffentlichung (Regel 46.1) zugehen.

Wo sind die Änderungen nicht einzureichen?

Die Änderungen können nur beim Internationalen Büro, nicht aber beim Anmeldeamt oder der internationalen Recherchenbehörde eingereicht werden (Regel 46.2).

Falls ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung eingereicht wurde/wird, siehe unten.

In welcher Form können Änderungen erfolgen?

Eine Änderung kann erfolgen durch Streichung eines oder mehrerer ganzer Ansprüche, durch Hinzufügung eines oder mehrerer neuer Ansprüche oder durch Änderung des Wortlauts eines oder mehrerer Ansprüche in der eingereichten Fassung.

Für jedes Anspruchsblatt, das sich aufgrund einer oder mehrerer Änderungen von dem ursprünglich eingereichten Blatt unterscheidet, ist ein Ersatzblatt einzureichen.

Alle Ansprüche, die auf einem Ersatzblatt erscheinen, sind mit arabischen Ziffern zu numerieren. Wird ein Anspruch gestrichen, so brauchen, die anderen Ansprüche nicht neu numeriert zu werden. Im Fall einer Neunumerierung sind die Ansprüche fortlaufend zu numerieren (Verwaltungsrichtlinien, Abschnitt 205 b)).

Die Änderungen sind in der Sprache abzufassen, in der die internationale Anmeldung veröffentlicht wird.

Welche Unterlagen sind den Änderungen beizufügen?

Begleitschreiben (Abschnitt 205 b)):

Die Änderungen sind mit einem Begleitschreiben einzureichen.

Das Begleitschreiben wird nicht zusammen mit der internationalen Anmeldung und den geänderten Ansprüchen veröffentlicht. Es ist nicht zu verwechseln mit der "Erklärung nach Artikel 19(1)" (siehe unten, "Erklärung nach Artikel 19 (1)").

Das Begleitschreiben ist nach Wahl des Anmelders in englischer oder französischer Sprache abzufassen. Bei englischsprachigen internationalen Anmeldungen ist das Begleitschreiben aber ebenfalls in englischer, bei französischsprachigen internationalen Anmeldungen in französischer Sprache abzufassen.

Im Begleitschreiben sind die Unterschiede zwischen den Ansprüchen in der eingereichten Fassung und den geänderten Ansprüchen anzugeben. So ist insbesondere zu jedem Anspruch in der internationalen Anmeldung anzugeben (gleichlautende Angaben zu verschiedenen Ansprüchen können zusammengefaßt werden), ob

- i) der Anspruch unverändert ist;
- ii) der Anspruch gestrichen worden ist;
- iii) der Anspruch neu ist;
- iv) der Anspruch einen oder mehrere Ansprüche in der eingereichten Fassung ersetzt;
- v) der Anspruch auf die Teilung eines Anspruchs in der eingereichten Fassung zurückzuführen ist.

Im folgenden sind Beispiele angegeben, wie Änderungen im Begleitschreiben zu erläutern sind:

1. [Wenn anstelle von ursprünglich 48 Ansprüchen nach der Änderung einiger Ansprüche 51 Ansprüche existieren]:
"Die Ansprüche 1 bis 29, 31, 32, 34, 35, 37 bis 48 werden durch geänderte Ansprüche gleicher Numerierung ersetzt; Ansprüche 30, 33 und 36 unverändert; neue Ansprüche 49 bis 51 hinzugefügt."
2. [Wenn anstelle von ursprünglich 15 Ansprüchen nach der Änderung aller Ansprüche 11 Ansprüche existieren]:
"Geänderte Ansprüche 1 bis 11 treten an die Stelle der Ansprüche 1 bis 15."
3. [Wenn ursprünglich 14 Ansprüche existierten und die Änderungen darin bestehen, daß einige Ansprüche gestrichen werden und neue Ansprüche hinzugefügt werden]:
"Ansprüche 1 bis 6 und 14 unverändert; Ansprüche 7 bis 13 gestrichen; neue Ansprüche 15, 16 und 17 hinzugefügt. "Oder" Ansprüche 7 bis 13 gestrichen; neue Ansprüche 15, 16 und 17 hinzugefügt; alle übrigen Ansprüche unverändert."
4. [Wenn verschiedene Arten von Änderungen durchgeführt werden]:
"Ansprüche 1-10 unverändert; Ansprüche 11 bis 13, 18 und 19 gestrichen; Ansprüche 14, 15 und 16 durch geänderten Anspruch 14 ersetzt; Anspruch 17 in geänderte Ansprüche 15, 16 und 17 unterteilt; neue Ansprüche 20 und 21 hinzugefügt."

"Erklärung nach Artikel 19(1)" (Regel 46.4)

Den Änderungen kann eine Erklärung beigelegt werden, mit der die Änderungen erläutert und ihre Auswirkungen auf die Beschreibung und die Zeichnungen dargelegt werden (die nicht nach Artikel 19 (1) geändert werden können).

Die Erklärung wird zusammen mit der internationalen Anmeldung und den geänderten Ansprüchen veröffentlicht.

Sie ist in der Sprache abzufassen, in der die internationale Anmeldung veröffentlicht wird.

Sie muß kurz gehalten sein und darf, wenn in englischer Sprache abgefaßt oder ins Englische übersetzt, nicht mehr als 500 Wörter umfassen

Die Erklärung ist nicht zu verwechseln mit dem Begleitschreiben, das auf die Unterschiede zwischen den Ansprüchen in der eingereichten Fassung und den geänderten Ansprüchen hinweist, und ersetzt letzteres nicht. Sie ist auf einem gesonderten Blatt einzureichen und in der Überschrift als solche zu kennzeichnen, vorzugsweise mit den Worten "Erklärung nach Artikel 19 (1)".

Die Erklärung darf keine herabsetzenden Äußerungen über den internationalen Recherchenbericht oder die Bedeutung von in dem Bericht angeführten Veröffentlichungen enthalten. Sie darf auf im internationalen Recherchenbericht angeführte Veröffentlichungen, die sich auf einen bestimmten Anspruch beziehen, nur im Zusammenhang mit einer Änderung dieses Anspruchs Bezug nehmen.

Auswirkungen eines bereits gestellten Antrags auf internationale vorläufige Prüfung

Ist zum Zeitpunkt der Einreichung von Änderungen nach Artikel 19 bereits ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung gestellt worden, so sollte der Anmelder in seinem Interesse gleichzeitig mit der Einreichung der Änderungen beim Internationalen Büro auch eine Kopie der Änderungen bei der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde einreichen (siehe Regel 62.2 a), erster Satz).

Auswirkungen von Änderungen hinsichtlich der Übersetzung der internationalen Anmeldung beim Eintritt in die nationale Phase

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß bei Eintritt in die nationale Phase möglicherweise anstatt oder zusätzlich zu der Übersetzung der Ansprüche in der eingereichten Fassung eine Übersetzung der nach Artikel 19 geänderten Ansprüche an die bestimmten/ausgewählten Ämter zu übermitteln ist.

Nähere Einzelheiten über die Erfordernisse jedes bestimmten/ausgewählten Amtes sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 4966/00/W0	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 99/06321	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 27/08/1999	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 01/09/1998
Anmelder ROCHE DIAGNOSTICS GMBH et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. ---

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☐ keine der Abb.

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDES GEGENSTANDES

IPK 7 C07K16/18 C12N5/10 G01N33/577 G01N33/68 C07K16/42

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^o	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 499 176 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 19. August 1992 (1992-08-19) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument --- -/--	1-15



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

^o Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

19. November 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

03/12/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Nooij, F

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie ^o	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>M. SOLIMENA ET AL.: "ICA 512, an autoantigen of type I diabetes, is an intrinsic membrane protein of neurosecretory granules."</p> <p>THE EMBO JOURNAL, Bd. 15, Nr. 9, 1. Mai 1996 (1996-05-01), Seiten 2102-2114, XP002123338 Oxford, Grossbritannien in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Seite 2102, rechte Spalte, Zeile 41 - Zeile 53 Seite 2103, linke Spalte, Zeile 38 - Zeile 41 Seite 2106, rechte Spalte, Zeile 24 - Zeile 29 Material and methods - Antibodies</p> <p>---</p>	1-15
A	<p>A. MADEC ET AL.: "Four IgG anti-islet human monoclonal antibodies isolated from a type 1 diabetes patient recognize distinct epitopes of glutamic acid decarboxylase 65 and are somatically mutated."</p> <p>THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, Bd. 156, Nr. 9, 1. Mai 1996 (1996-05-01), Seiten 3541-3549, XP002123339 Baltimore, MD, VSA in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Seite 3541, rechte Spalte, Zeile 26 -Seite 3542, linke Spalte, Zeile 14</p> <p>---</p>	1-15
A	<p>M. PAYTON ET AL.: "Relationship of the 37,000- and 40,000-Mr tryptic fragments of islet antigens in insulin-dependent diabetes to the protein tyrosine phosphatase-like molecule IA-2."</p> <p>THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, Bd. 96, 1. September 1995 (1995-09-01), Seiten 1506-1511, XP000612574 New York, NY, VSA in der Anmeldung erwähnt</p> <p>---</p>	1-15
A	<p>US 5 200 318 A (RABIN ET AL.) 6. April 1993 (1993-04-06) Ansprüche</p> <p>-----</p>	1-15

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/06321

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP 499176	A	19-08-1992	DE	4129849 A	27-08-1992
			AT	161581 T	15-01-1992
			DE	59209079 D	05-02-1998
			ES	2112869 T	16-04-1998
			JP	2085501 C	23-08-1996
			JP	5115296 A	14-05-1993
			JP	7116239 B	13-12-1995
			US	5888813 A	30-03-1999

US 5200318	A	06-04-1993	AU	3854393 A	18-11-1993
			CA	2095278 A	14-11-1993
			EP	0569800 A	18-11-1993
			JP	6034629 A	10-02-1994

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT PCT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

REC'D 17 NOV 2000

WIPO PCT



Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 4966/00/WO	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/06321	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 27/08/1999	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 01/09/1998
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C07K16/18		
Anmelder ROCHE DIAGNOSTICS GMBH et al.		

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
 - ☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt 3 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☒ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 02/02/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 15.11.2000
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Goetz, M Tel. Nr. +49 89 2399 8697 

I. Grundlag des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-19 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-14 eingegangen am 21/10/2000 mit Schreiben vom 20/10/2000

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: , zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, dass das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, dass die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1 - 14
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1 - 14
	Nein: Ansprüche	
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1 - 14
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt

VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:
siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
siehe Beiblatt

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Die folgenden Dokumente werden als relevant erachtet:

D1: EP-A-0 499 176 (Boehringer Mannheim GmbH), 19. August 1992

D2: SOLIMENA et al., EMBO J. 15/9, 1. Mai 1996 (1996-05-01), S. 2102-2114

- 1.1. **D1** offenbart die technischen Massnahmen zur Bereitstellung humaner Autoantikörper gegen Inselzellenantigene. Weiters sind aus **D2** die autoantigenen Eigenschaften von IA-2 (auch ICA 512) bekannt.
2. Die neu eingereichten Ansprüche 1 - 14 beziehen jedoch sich auf einen gegen das Inselzellenantigen IA-2 gerichteten Antikörper, zu dessen Bereitstellung eine Reihe von **besonderen technischen Massnahmen zur Überwindung unvorhergesehener Schwierigkeiten** ergriffen wurden (Seite 6/Zeile 4 - Seite 8/Zeile 27), die weder in **D1** noch **D2** offenbart wurden; daher ist der jeweilige Gegenstand der Ansprüche 1 - 14, die sich auf durch das genannte Bereitstellungsverfahren erhaltenen monoklonalen Antikörper, die derart erzeugte spezielle Zelllinie A-2, 96-3-1 mit der Hinterlegungsnummer DSM ACC2365, oder den daraus isolierten monoklonalen humanen Antikörper beziehen, neu (Art. 33(2) PCT) und beruht auf erfinderischer Tätigkeit (Art. 33(3) PCT).
3. Der Gegenstand des Anspruchs 6 ist insofern ausreichend klar (Art. 6 PCT), als aus Seite 9/Zeilen 4 - 18 ersichtlich ist, wie der Fachmann feststellen kann, ob ein bestimmter vorliegender anti-IA-2 Antikörper unter den Begriff "... *in äquivalenter Weise bindefähig* ..." fällt.

Zu Punkt VII

Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Die Beschreibung steht nicht, wie in Regel 5.1 a) iii) PCT vorgeschrieben, in Einklang mit dem Wortlaut der **geänderten** Ansprüche.

Zu Punkt VIII

Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Der nunmehr gültige Anspruch 1 entspricht dem ursprünglich eingereichten Anspruch 3; durch dessen Rückbezug auf den ursprünglich eingereichten Anspruch 1 war darin auch das Merkmal "... die spezifisch mit dem Inselzellenantigen IA-2 reagieren ..." enthalten; dieses Merkmal fehlt nun im geänderten Anspruch 1, wodurch letzterer formal unklar wird (Art. 6 PCT), da nicht eindeutig ersichtlich ist, gegen welches Antigen der beanspruchte monoklonale Antikörper gerichtet ist.

Patentansprüche

1. Humane monoklonale Antikörper, erhältlich durch die Verfahrensschritte
Immortalisieren von humanen Lymphozyten von Prädiabetikern oder Diabetikern
5 mit hohen Serumantikörper-Titern gegen IA-2, Kultivierung der immortalisierten
Lymphozyten mit Wachstumsfaktoren unter gleichzeitiger Entfernung von
inhibitorischen Faktoren, Nachweis der IA-2-spezifischen humanen monoklonalen
Antikörper im Kulturüberstand, Klonierung der humanen immortalisierten Zelllinie,
die diesen Antikörper produziert, in Anwesenheit von Feederzellen, die keine
10 cytotoxischen T-Lymphozyten enthalten, Vermehrung dieser immortalisierten Zelle
gegebenenfalls unter Zusatz von Wachstumsfaktoren und Isolierung des von diesem
Klon produzierten monoklonalen Antikörpers.
2. Humane monoklonale Antikörper gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß
15 sie spezifisch mit IA-2ic, dem cytoplasmatischen Teil von IA-2 reagieren.
3. Humane monoklonale Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 2, dadurch
gekennzeichnet, daß sie der Klasse IgG angehören.
- 20 4. Humane monoklonale Antikörper nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß
sie der Subklasse IgG1 angehören.
5. Humane monoklonale Antikörper nach den Ansprüchen 1 bis 4, erhältlich aus der
Zelllinie IA-2, 96-3-1 mit der Hinterlegungsnummer DSM ACC2365.
25
6. Humane monoklonale Antikörper nach den Ansprüchen 1 bis 5, die in äquivalenter
Weise mit IA-2 bindefähig sind wie die Antikörper, die von der Zelllinie IA-2, 96-3-
1, Hinterlegungsnummer DSM ACC2365, produziert werden.
- 30 7. Zelllinie IA-2, 96-3-1 mit der Hinterlegungsnummer DSM ACC2365.

8. Verfahren zur Herstellung von humanen monoklonalen Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 6 enthaltend die Schritte Immortalisieren von humanen Lymphozy-
5 ten von Prädiabetikern oder Diabetikern mit hohen Serumantikörper-Titern gegen IA-2, Kultivierung der immortalisierten Lymphozyten mit Wachstumsfaktoren unter gleichzeitiger Entfernung von inhibitorischen Faktoren, Nachweis der IA-2-spezifischen humanen monoklonalen Antikörper im Kulturüberstand, Klonierung der humanen immortalisierten Zelllinie, die diesen Antikörper produziert, in Anwesenheit
10 von Feederzellen, die keine cytotoxischen T-Lymphozyten enthalten, Vermehrung dieser immortalisierten Zelle gegebenenfalls unter Zusatz von Wachstumsfaktoren, und Isolierung des von diesem Klon produzierten monoklonalen Antikörpers.
9. Verwendung eines humanen monoklonalen Antikörpers nach einem der Ansprüche
15 1 bis 6 als Standard in einem Verfahren zur Bestimmung von Antikörpern gegen ein Inselzellantigen.
10. Verwendung eines humanen monoklonalen Antikörpers nach einem der Ansprüche
20 1 bis 6 als Rezeptor in einem Verfahren zur Bestimmung von Antikörpern gegen ein Inselzellantigen.
11. Verwendung eines humanen monoklonalen Antikörpers nach einem der Ansprüche
1 bis 6 zur Gewinnung des Inselzellantigens IA-2.
- 25 12. Verfahren zum Nachweis von Antikörpern gegen das Inselzellantigens IA-2 in einer Probe, dadurch gekennzeichnet, daß als Standard ein monoklonaler Antikörper gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 eingesetzt wird.

13. Anti-idiotypischer Antikörper, der gegen Antikörper, die mit dem Inselzellantigen IA-2 reagieren, gerichtet ist, erhältlich durch die Immunisierung mit einem Antikörper gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, Immortalisierung der Milzzellen der immunisierten Tiere, Klonierung von solchen immortalisierten Zellen, die Antikörper produzieren, die an Antikörper gegen IA-2 binden und Isolierung der von diesen Klonen produzierten Antikörper nach bekannten Verfahren.
- 10 14. Verfahren zum Nachweis des Inselzellantigens IA-2 in einer Probe, dadurch gekennzeichnet, daß als Bindepartner mindestens ein monoklonaler Antikörper gemäß den Ansprüchen 1 bis 6 eingesetzt wird.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

3

Applicant's or agent's file reference 4966/00/WO	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP99/06321	International filing date (day/month/year) 27 August 1999 (27.08.99)	Priority date (day/month/year) 01 September 1998 (01.09.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K 16/18		
Applicant ROCHE DIAGNOSTICS GMBH		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 5 sheets, including this cover sheet.

☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 3 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☒ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 02 February 2000 (02.02.00)	Date of completion of this report 15 November 2000 (15.11.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP99/06321

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

☐ the international application as originally filed.

☒ the description, pages 1-19, as originally filed,
 pages _____, filed with the demand,
 pages _____, filed with the letter of _____,
 pages _____, filed with the letter of _____.

☒ the claims, Nos. _____, as originally filed,
 Nos. _____, as amended under Article 19,
 Nos. _____, filed with the demand,
 Nos. 1-14, filed with the letter of 21/10/00,
 Nos. _____, filed with the letter of _____.

☐ the drawings, sheets/fig _____, as originally filed,
 sheets/fig _____, filed with the demand,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

☐ the description, pages _____

☐ the claims, Nos. _____

☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 99/06321

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1 - 14	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1 - 14	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1 - 14	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

1. The following documents are considered to be relevant:

D1: EP-A-0 499 176 (Boehringer Mannheim GmbH),
19 August 1992

D2: SOLIMENA et al., EMBO J. 15/9, 1 May 1996
(1996-05-01), pages 2102 - 2114

- 1.1. **D1** discloses the technical measures for providing human autoantibodies against islet cell antigens. In addition, **D2** discloses the autoantigenic properties of IA-2 (and also ICA 512).

2. The newly filed Claims 1 - 14, however, relate to an antibody directed against the islet cell antigen IA-2, for the preparation of which antibody a number of **special technical measures for overcoming unforeseen difficulties** were adopted (page 6, line 4 - page 8, line 27) which were not disclosed in either **D1** or **D2**; consequently, the respective subject matter of Claims 1 - 14, which relate to monoclonal antibodies obtained by the above-mentioned method of preparation, the special cell line A-2, 96-3-1 with

.../...

(Continuation of V.2)

the deposition number DSM ACC2365 prepared by said method, or the monoclonal human antibody isolated therefrom, is novel (PCT Article 33(2)) and involves an inventive step (PCT Article 33(3)).

3. The subject matter of Claim 6 is sufficiently clear (PCT Article 6), since it is evident from page 8, lines 4 - 18 how a person skilled in the art can ascertain whether a particular anti-IA-2 antibody present falls under the term "... *capable of binding in an equivalent manner* ...".

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 99/06321

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

The description is not consistent with the text of the
amended claims (PCT Rule 5.1(a)(iii)).

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

The present Claim 1 corresponds to the originally filed Claim 3; because of its back-reference to the originally filed Claim 1, the feature "... which specifically react with the islet cell antigen IA-2 ..." was also included therein; this feature is now missing from the amended Claim 1, which is therefore formally unclear (PCT Article 6), because it is not evident against which antigen the claimed monoclonal antibody is directed.



PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C07K 16/18, C12N 5/10, G01N 33/577, 33/68, C07K 16/42	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/12558 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 9. März 2000 (09.03.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/06321 (22) Internationales Anmeldedatum: 27. August 1999 (27.08.99) (30) Prioritätsdaten: 198 39 736.4 1. September 1998 (01.09.98) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE/DE]; D-68298 Mannheim (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ENDL, Josef [DE/DE]; Ulmenstrasse 12, D-82362 Weilheim (DE). WILD, Thomas [AT/DE]; Trifthofstrasse 23, D-82362 Weilheim (DE). BERLO, Suzanne, Elisabeth [NL/NL]; Burg v/d Oeverstr. 26, NL-5076 GL Haaren (NL). LITTY, Verena [DE/DE]; Landwehrstrasse 32c, D-80336 München (DE). (74) Gemeinsamer Vertreter: ROCHE DIAGNOSTICS GMBH; Patentabteilung, D-68298 Mannheim (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>
(54) Title: HUMAN MONOCLONAL ANTIBODIES DIRECTED AGAINST THE ISLET CELL ANTIGEN IA-2 (54) Bezeichnung: HUMANE MONOKLONALE ANTIKÖRPER GEGEN INSELZELLANTIGEN IA-2 (57) Abstract <p>The invention relates to human monoclonal antibodies directed against the islet cell antigen IA-2, to a method for the production thereof, and to the use of the human monoclonal antibodies in a method for detecting antibodies directed against IA-2. The invention also relates to a method for detecting the antibodies directed against the islet cell antigen IA-2, and to a method for detecting the islet cell antigen IA-2 in a sample.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung betrifft humane monoklonale Antikörper gegen das Inselzellantigen IA-2, ein Verfahren zu ihrer Herstellung, die Verwendung der humanen monoklonalen Antikörper in einem Verfahren zum Nachweis von Antikörpern gegen IA-2, ein Verfahren zum Nachweis von Antikörpern gegen Inselzellantigen IA-2 sowie ein Verfahren zum Nachweis des Inselzellantigens IA-2 in einer Probe.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Humane monoklonale Antikörper gegen Inselzellantigen IA-2

5

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind humane monoklonale Antikörper gegen das Inselzellantigen IA-2, ein Verfahren zu ihrer Herstellung, die Verwendung der humanen monoklonalen Antikörper in einem Verfahren zum Nachweis von Antikörpern gegen IA-2, ein Verfahren zum Nachweis von Antikörpern gegen Inselzellantigen IA-2, sowie ein Verfahren zum Nachweis von IA-2.

10

Der insulinabhängige Diabetes mellitus vom Typ I (IDDM) beruht auf einer autoimmunen Zerstörung der insulinproduzierenden β -Zellen des Pankreas. Die Entwicklung von Autoantikörpern gegen β -Zellantigene geht dabei der Entwicklung eines klinisch diagnostizierbaren Diabetes voraus. Diese Autoantikörper dienen als sensitive Marker zur Identifikation der präklinischen Krankheitsphase. Auch in frisch diagnostizierten Diabetiker-Patienten findet man häufig Antikörper, die mit den β -Zellen in den Langerhans'schen Inseln reagieren. Die Gesamtheit der Autoantikörper wird auch als Islet Cell Antibodies (ICA) bezeichnet.

20

ICA sind sensitive und spezifische Marker für die Prognose und Diagnose von humanem IDDM. Zu den bisher charakterisierten Inselzellantigenen, gegen die Autoantikörper gebildet werden, zählen Insulin (Palmer et al. 1983, Science 222, 1337-1339), die Glutamat-Decarboxylase (GAD, Bækkeskov et al. 1990, Nature 347, 151-156), Carboxypeptidase H (Castano et al 1991, J. Clin. Endocrinol. Metab. 73, 1197-1201) Inselzellantigen ICA 69 (Pietropaolo et al. 1993, J. Clin. Invest. 92, 359-371) und das Antigen IA-2, das auch als ICA512 bezeichnet wird (Solimena et al. 1996, EMBO J. 15, 2102-2114).

25

Bislang konnte noch nicht geklärt werden, ob Autoantikörper, die gegen β -Zellantigene gerichtet sind, zur Entwicklung der Krankheit direkt beitragen oder ob das Auftreten der Autoantikörper ein Phänomen ist, das nach der Zerstörung der β -Zellen auftritt.

- 5 Nach heutigem Kenntnisstand ist jedoch das Auftreten von Autoantikörpern mit der Entwicklung eines Diabetes korreliert.

Es hat sich gezeigt, daß insbesondere Autoantikörper gegen IA-2 in den meisten frisch diagnostizierten IDDM-Patienten auftreten und daß die IA-2-spezifischen Autoanti-
10 körper mit einem schnellen Fortschreiten der Diabetes-Erkrankung assoziiert sind. IA-2-spezifische Autoantikörper scheinen darüberhinaus spezifischer für IDDM zu sein als GAD-Autoantikörper und außerdem weniger häufig bei anderen Autoimmunkrankheiten ohne IDDM aufzutreten (Roll und Ziegler 1997, Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes 105, 1-14).

- 15 Beim Autoantigen IA-2 handelt es sich um ein Transmembran-Protein mit einem membran-durchquerenden Segment und einer cytoplasmatischen Domäne (IA-2ic), die die Epitope für die Antikörperbindung enthält (Solimena et al. 1996, EMBO J. 15, 2102-2114). Als intrinsisches Membran-Protein sekretorischer Vesikel wird IA-2 in peptid-
20 sekretierenden endokrinen Zellen sowie in Neuronen, die neurosekretorische Vesikel enthalten, exprimiert. IA-2 besitzt eine signifikante Homologie zu IA-2 β , das auch unter der Bezeichnung Phogrin bekannt ist. IA-2 β ist wie IA-2 ein Transmembranprotein, wird jedoch anders als IA-2 bevorzugt in β -Zellen exprimiert. IA-2 β und IA-2 sind Proteine vom Rezeptortyp und gehören beide zur Klasse der Protein-Tyrosin-
25 Phosphatasen (Roll und Ziegler 1997, supra).

- Die Bestimmung der ICA (Islet Cell Antibodies) zum Nachweis von IDDM erfolgt im Stand der Technik durch Messungen an Pankreas-Gewebeschnitten mit indirekter Immunfluoreszenz. Hierbei werden die Autoantikörper in der zu untersuchenden Probe,
30 die an die Inselzellstrukturen binden, durch fluoreszenzmarkierte, für Human-IgG spezifische Antikörper nachgewiesen. Allerdings sind diese ICA-Messungen technisch

sehr aufwendig und schwierig zu standardisieren, da die Ergebnisse, die mit unterschiedlichem pankreatischen Gewebe von verschiedenen Spendern erhalten werden, stark variieren.

- 5 Im Stand der Technik werden Autoantikörper gegen IA-2 und GAD auch durch einfache Radioliganden-Bindungsassays in Serumproben bestimmt. Dabei werden in vitro translatierte, radioaktiv markierte Antigene verwendet (Dittler, J. et al 1998, Diabetes 47, 592-597). Zur Herstellung der radioaktiv markierten Antigene wird die cDNA des jeweiligen Antigens mittels eines Kaninchen-Retikulozyten-Lysates in vitro transkri-
- 10 biert. Die mRNA wird dann in Anwesenheit von radioaktiv markierten Aminosäuren (im allgemeinen mit ^{35}S , Schwefel-35 markiert) translatiert. Die Bindung der Autoantikörper an das markierte Antigen wird nach Abtrennung des Antigen-Antikörperkomplexes vom freien Antigen beispielsweise durch Filtration oder Festphasenbindung über das radioaktive Signal des markierten Antigens nachgewiesen.

- 15 Diese Nachweismethoden können zwar zum Teil automatisiert werden, haben jedoch den großen Nachteil, daß radioaktiv gearbeitet werden muß, was aufwendige und kostspielige Vorsichtsmaßnahmen erfordert. Die durch in-vitro-Translation erzielbaren Markierungseffizienzen für das Antigen sind von Batch zu Batch sehr variabel. Außerdem sind die markierten Antigene wegen eintretender Radiolyse bzw. wegen der kurzen
- 20 Halbwertszeit des Schwefel-35 nur kurze Zeit haltbar.

- Ein diagnostisch einfach, schnell und in automatisierter Form durchzuführender Test zum direkten Nachweis der IA-2-spezifischen Autoantikörper ist im Stand der Technik
- 25 bisher nicht beschrieben. Dies ist insbesondere darauf zurückzuführen, daß bisher keine standardisierten IA-2-spezifischen Autoantikörper existieren. Als Standard- oder Eichmaterial wurden bisher lediglich hochtitrige Seren von IDDM-Patienten verwendet. Der Nachteil hierbei ist, daß ein solches Serum nicht in unbegrenzter Menge zur Verfügung steht und somit chargen- bzw. patientenabhängige Schwankungen im Antikörpergehalt
- 30 des jeweiligen Standardserums bestehen. Ein Vergleich von Versuchsergebnissen aus unterschiedlichen Laboratorien ist dadurch nicht gegeben.

Aufgabe war es daher, humane monoklonale Antikörper zur Verfügung zu stellen, die spezifisch das Inselzellantigen IA-2 erkennen, sowie ein diagnostisches Testverfahren zum quantitativen Nachweis der IA-2-spezifischen Autoantikörper mittels einer Standardkurve zur Verfügung zu stellen, das die Nachteile des Standes der Technik zum großen Teil überwindet.

Die Aufgabe wird gelöst durch humane monoklonale Antikörper, die spezifisch mit dem Inselzellantigen IA-2 reagieren. Dazu gehören beispielsweise die Antikörper, die von der Zelllinie IA-2, 96-3-1, hinterlegt am 13.08.1998 unter der Nummer DSM ACC2365 bei der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland), produziert werden.

Gegenstand der Erfindung sind daher humane monoklonale Antikörper gegen das Inselzellantigen IA-2. Bevorzugt sind diese Antikörper vom IgG-Isotyp, besonders bevorzugt vom IgG1-Isotyp.

Im Stand der Technik ist bekannt, daß gegen das Inselzellantigen GAD (Glutamat-Decarboxylase) humane Autoantikörper erzeugt werden können (EP-A-0 499 176). Das dort beschriebene Verfahren umfaßt folgende Schritte:

Immortalisieren von humanen Lymphozyten von Prädiabetikern oder Diabetikern, Behandeln des Kulturüberstandes der (durch EBV-Transformation) immortalisierten Zellen mit einem Konjugat aus Antikörpern gegen humanes Fcγ und einer Markierung, anschließende Behandlung mit humanem Immunglobulin, Inkubieren mit immobilisierten humanen Pankreas-Inselzellen oder immobilisierter GAD, Identifizierung einer immortalisierten humanen Zellkultur, die einen Antikörper gegen Pankreas-Inselzellen produziert, über die Bestimmung der an die immobilisierten Inselzellen oder die immobilisierte GAD gebundene Markierung, Isolierung einer humanen immortalisierten Zelle, die diesen Antikörper produziert, Vermehrung dieser immortalisierten Zelle und Isolierung des von diesen Zellen produzierten monoklonalen Antikörpers.

Mit dem in EP-A-0 499 176 beschriebenen Verfahren ist es jedoch nicht möglich, humane monoklonale Antikörper gegen IA-2 herzustellen. Die erste Schwierigkeit zeigt sich bereits bei der Auswahl der Spender-Lymphozyten. Es können nicht beliebige
5 Spender-Lymphozyten verwendet werden, sondern die Lymphozyten müssen von Prädiabetikern oder Diabetikern mit ausgewählt hohen IA-2-spezifischen Serumantikörpertitern stammen.

Die Antikörper-Titer werden durch einen Radioliganden-Bindungsassay ermittelt. Bei
10 diesem Assay wird die für IA-2 kodierende DNA mittels eines Retikulozyten-Lysates in vitro transkribiert und in Anwesenheit von ^{35}S -Methionin translatiert. Anschließend werden wenige Mikroliter (2 – 5 μl haben sich als geeignet erwiesen) Patientenserum mit dem radioaktiv markierten IA-2 inkubiert und die Immunkomplexe über Protein-A Sepharose vom freien Antigen abgetrennt. Die Bestimmung der an die Protein-A
15 Sepharose gebundene Radioaktivität erfolgt in einem Szintillationszähler. Durch ein hochtitriges ausgewähltes Patientenserum werden die gemessenen cpm in arbiträre Units umdefiniert. Zum Beispiel wurde bei dem in dieser Studie verwendeten Patientenserum definiert, daß 1000 cpm 100 U entsprechen. Dieses Patientenserum wird bei Bestimmungen als arbiträrer Standard mitgeführt. Für die Transformationen wurden nur
20 Lymphozyten verwendet, deren Spender einen Titer von größer als 80 U aufwiesen, da nur von diesen Spendern IA-2 positive Primärkulturen entdeckt wurden.

Darüberhinaus hat sich eine Vorselektion auf IgG-produzierende B-Lymphozyten als sinnvoll erweisen. Im peripheren Blut befinden sich ca. 10mal mehr IgM-produzierende
25 B-Lymphozyten als IgG-produzierende B-Zellen. Andererseits sind die relevanten Autoantikörper gegen IA-2 vom IgG-Subtyp (Zhang et al 1997, Diabetes 46, 40-43). Durch Isolierung der Membran-IgG positiven B-Lymphozyten kann die relevante B-Zell Subpopulation um einen Faktor 10 angereichert werden. Die Isolierung erfolgt durch Markierung der humanen B-Lymphozyten mit einem für Human-IgG spezifischen
30 Antikörper aus der Maus und nachfolgender Bindung von Magnetobeads, die mit Schaf-

anti-Maus-IgG beladen sind. Durch Anlegen eines Magneten können die markierten Zellen aus der Zellsuspension positiv selektioniert werden.

Weiterhin zeigen sich Probleme bei der Anzucht der immortalisierten Lymphozyten, da
5 die immortalisierten IA-2 spezifischen B-Zellen nur eine geringe Proliferationsrate auf-
weisen und häufig von unspezifischen, aber schnell wachsenden immortalisierten B-
Zellen überwachsen werden. Es hat sich gezeigt, daß durch den Zusatz von Wachstums-
faktoren wie IL-6 oder IL-10 die Proliferation der immortalisierten IA-2-spezifischen B-
Zelllinien entscheidend verbessert werden kann. Ein zusätzliches Problem war, daß die
10 immortalisierten B-Zelllinien Faktoren sezernierten, die das Wachstum der Zelllinien
negativ beeinflussen. Zu diesen Faktoren gehören vor allem TGF-beta, IF-gamma und
TNF-alpha. Die Entfernung dieser inhibitorischen Faktoren durch häufiges Wechseln
des Kulturmediums bewirkt eine höhere Transformationsrate und ein schnelleres
Wachstum der EBV transformierten B-Zell Linien.

15
Entscheidend für die erfolgreiche Klonierung (siehe unten) der entstehenden EBV-
transformierten B-Lymphozyten ist es, von vornherein limitierte Mengen an B-Lym-
phozyten in die einzelnen Wells (Vertiefungen der Mikrotiterplatte) einzubringen. Im
Stand der Technik werden mehrere tausend gereinigte periphere mononukleäre Zellen
20 pro Well empfohlen (Peyron, E. et al 1994, J. Immunology 153, 1333-1339; Madec, A.-
M. et al 1996, J. Immunology 156, 3541-3549). Überraschenderweise hat sich gezeigt,
daß für die Primärtransformation nur maximal 400 IgG-positive Zellen/Well eingesetzt
werden können. Die Transformationsrate beträgt etwa 1 von 80 B-Zellen, das heißt, pro
Well wachsen maximal 5 verschiedene Klone. Dadurch erhöht sich die Wahrscheinlich-
25 keit, daß man bei der anschließenden Einzelzell-Klonierung, bei der nur wenige EBV-
transformierte B-Zell Klone wachsen (oft nur 1-2%), die relevanten Klone isolieren
kann. Ebenfalls überraschend ist, daß sich die meisten positiven Primärwells bei noch
niedrigerer Einsaatdichte isolieren ließen, was dahingehend interpretiert werden kann,
daß bereits bei 400 B-Zellen pro Well zuviele Klone entstehen und dadurch langsamer
30 wachsende Klone von schneller wachsenden unterdrückt werden.

Nach einer Wachstumsperiode von ca. 2 Wochen werden die Kulturüberstände der Primär-Zellkulturen dann beispielsweise mittels eines ELISA-Tests an immobilisiertem IA-2 auf die Produktion von IA-2-spezifischen Antikörpern getestet. Besonders geeignet hat sich erfindungsgemäß das Screening auf IA-2-spezifische Antikörper mittels der
5 cytoplasmatischen Domäne des IA-2 erwiesen, die auch als IA-2ic bezeichnet wird.

Bei der anschließenden Einzelzell-Klonierung zur Stabilisierung der Zelllinien müssen sogenannte Feederzellen zugesetzt werden, da EBV-transformierte B-Zelllinien in niedriger Zelldichte (<25 pro Well) nicht überlebensfähig sind. Als Feederzellen dienen
10 autologe (vom selben Spender stammende) oder allogene (von einem anderen Spender stammende), mit 4000 rad bestrahlte periphere Blutlymphozyten.

Die Klonierungseffizienz kann dadurch entscheidend verbessert werden, daß man die cytotoxischen T-Lymphozyten (CD8 positive Zellen) aus der Feederzell-Population
15 entfernt. Die Entfernung der CD8-Zellen erfolgt bevorzugt durch immunomagnetische Separation. Dazu werden die peripheren Blutlymphozyten zum Beispiel mit magnetischen Microbeads inkubiert, an die monoklonale Antikörper gegen das humane CD8 Antigen gekoppelt sind. Durch Anlegen eines Magneten werden die markierten Zellen entfernt, die restlichen Zellen bestrahlt und in einer Konzentration von 20 000 - 50 000
20 Zellen pro Well eingesetzt.

Ebenfalls als vorteilhaft bei der Herstellung der erfindungsgemäßen Antikörper hat es sich erwiesen, eine Qualitätsüberprüfung der Feederzellen durchzuführen. Es konnte festgestellt werden, daß sich die wachstumsunterstützende Funktion dieser Feederzellen
25 von Spender zu Spender stark unterscheidet. Die Feederzellen von manchen Spendern wirkten sogar inhibierend auf das Wachstum. Deshalb war ein wichtiger Fortschritt dadurch erzielbar, daß jeder neue Batch an Feederzellen zunächst auf einer etablierten monoklonalen EBV-transformierten B-Zelllinie (MICA 5) als Testzelllinie auf seine Eignung für die Klonierungsprozedur untersucht wurde und "schädliche" Feederbatches
30 aussortiert wurden. Dazu wurden Einzelzell-Klonierungen von MICA 5 auf bestrahlten Blutlymphozyten von verschiedenen Spendern durchgeführt. Nach ca. 3 Wochen wurde

die Klonierungseffizienz durch mikroskopische Bestimmung der Anzahl der bewachsenen Wells bestimmt. Es wurden nur solche Feederzellen verwendet, mit denen eine Klonierungseffizienz von mindestens 20% erzielt werden konnte.

- 5 Der Immortalisierungsschritt kann durch die dem Fachmann bekannte Transformation mit EBV (Epstein-Barr-Virus) erfolgen. Diese Transformationsmethode ist erfindungsgemäß bevorzugt. Die am häufigsten in der Literatur beschriebene Methode zur EBV-Transformation (siehe Ifversen, P. et al 1993, Hum. Antibod. Hybridomas 4, 115-123) besteht darin, die B-Lymphozyten mit EBV für 2-3 Stunden zu inkubieren, um die
- 10 Virusaufnahme zu erlauben. Danach werden die Zellen gewaschen und dadurch das Virus entfernt. Überraschenderweise konnte jedoch festgestellt werden, daß eine erhöhte Transformationsrate dadurch zu erzielen ist, daß man das Virus nicht auswäscht, sondern während der gesamten Inkubationsdauer bis zum ersten Medienwechsel (nach ca. 7 Tagen) zusammen mit den B-Zellen inkubiert.

- 15 Die Immortalisierung kann jedoch auch durch Fusion mit geeigneten Myeloma-Zellen durchgeführt werden. Denkbar ist auch die Herstellung der erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper gegen IA-2 über die sogenannte Phage-Display-Methode (Nissim, A. et al 1994, EMBO J. 13, 3, 692-698). Dabei wird mRNA direkt aus den Lympho-
- 20 zyten der IDDM-Patienten isoliert. Aus der damit hergestellten cDNA können die Immunglobulin-Gene amplifiziert werden (beispielsweise mittels Polymerasekettenreaktion). Die so erzeugten Gene können wiederum in einer Phagen-Library als Fab oder single chain Fv exprimiert werden, aus der dann die an IA-2 bindenden Phagen isoliert werden.

- 25 Erst durch die Überwindung der oben geschilderten Schwierigkeiten war es möglich, humane monoklonale Antikörper gegen das Inselzellantigen IA-2 herzustellen.

- Ein bevorzugter Gegenstand der Erfindung sind daher monoklonale Antikörper, die von
- 30 der Zelllinie IA-2, 96-3-1, hinterlegt am 13.08.1998 unter der Nummer DSM ACC2365 bei der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH,

Braunschweig, Deutschland), produziert werden. Die Zelllinie DSM ACC2365 ist ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

- Ebenfalls ein Gegenstand der Erfindung sind Antikörper, die in äquivalenter Weise wie
- 5 die von der Zelllinie IA-2, 96-3-1 (DSM ACC2365) produzierten mit IA-2 bindefähig sind. Unter dem Begriff "in äquivalenter Weise bindefähig" werden Antikörper verstanden, bei denen eine Epitopüberlappung mit dem definierten, bekannten Antikörper nachweisbar ist. Diese Epitopüberlappung kann mit Hilfe eines kompetitiven Testsystems leicht nachgewiesen werden. Dazu wird zum Beispiel mit Hilfe eines Enzym-
- 10 Immunoassays überprüft, inwieweit ein Antikörper mit dem bekannten Antikörper um die Bindung an ein definiertes Antigen oder ein definiertes Epitop konkurriert (beispielsweise IA-2ic). Dazu inkubiert man beispielsweise immobilisiertes IA-2ic-Antigen mit dem bekannten monoklonalen Antikörper, der eine Markierung trägt und einem Überschuß des in Betracht gezogenen Antikörpers. Durch Nachweis der gebundenen
- 15 Markierung kann dann leicht festgestellt werden, inwieweit der in Betracht gezogene Antikörper den definierten Antikörper aus der Bindung an das Antigen verdrängen kann. Ist eine Verdrängung von mindestens 50 % bei 10^5 -fachem Überschuß gegeben, so liegt eine Epitopüberlappung vor.
- 20 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind außerdem humane monoklonale Antikörper gegen das Inselzellantigen IA-2, die erhältlich sind durch die Verfahrensschritte
- Immortalisieren von humanen Lymphozyten von Prädiabetikern oder Diabetikern mit hohen Serumantikörper-Titern (>80 U) gegen IA-2, Kultivierung der immortalisierten Lymphozyten mit Wachstumsfaktoren unter gleichzeitiger Entfernung von inhibitorischen Faktoren durch häufigen Medienwechsel, Nachweis der IA-2-spezifischen hu-
- 25 manen monoklonalen Antikörper im Kulturüberstand bevorzugt mittels ELISA, Klonierung der humanen immortalisierten Zelllinie, die diesen Antikörper produziert, in Anwesenheit von Feederzellen, die keine cytotoxischen T-Lymphozyten enthalten, Vermehrung dieser immortalisierten Zelle gegebenenfalls unter Zusatz von Wachstumsfaktoren,
- 30 und Isolierung des von diesem Klon produzierten monoklonalen Antikörpers.

Ebenfalls ein Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von humanen monoklonalen Antikörpern, die spezifisch mit dem Inselzellantigen IA-2 reagieren, enthaltend die Schritte Immortalisieren von humanen Lymphozyten von Prädiabetikern oder Diabetikern mit hohen Serumantikörper-Titern (>80 U/ml) gegen IA-2, Kultivierung der immortalisierten Lymphozyten mit Wachstumsfaktoren unter gleichzeitiger Entfernung von inhibitorischen Faktoren durch häufigen Medienwechsel, Nachweis der IA-2-spezifischen humanen monoklonalen Antikörper im Kulturüberstand, bevorzugt mittels ELISA, Klonierung der humanen immortalisierten Zelllinie, die diesen Antikörper produziert, in Anwesenheit von Feederzellen, die keine cytotoxischen T-Lymphozyten enthalten, Vermehrung dieser immortalisierten Zelle gegebenenfalls unter Zusatz von Wachstumsfaktoren, und Isolierung des von diesem Klon produzierten monoklonalen Antikörpers.

Die Durchführung der einzelnen Verfahrensschritte erfolgt so wie in den vorhergehenden Abschnitten beschrieben.

Unter dem Begriff "monoklonaler Antikörper" sind im Sinne der Erfindung neben den intakten Immunglobulinen auch sämtliche Antikörperfragmente zu verstehen. Dazu gehören beispielsweise Fab, Fab' oder $F(ab)_2$ -Fragmente. Wird der Begriff "Antikörper" ohne den Zusatz "monoklonal" oder "polyklonal" verwendet, so sind immer beide Arten von Antikörpern, sowie chimäre Konstrukte und alle oben aufgeführten Fragmente gemeint.

Die erfindungsgemäßen IA-2-spezifischen monoklonalen Antikörper reagieren spezifisch mit IA-2, wobei sie bevorzugt mit dem cytoplasmatischen Teil von IA-2, dem sogenannten IA-2ic reagieren. Gegenstand der Erfindung sind daher auch Antikörper gegen IA-2, die spezifisch mit dem cytoplasmatischen Teil von IA-2, dem sogenannten IA-2ic reagieren. Sie werden analog zu den zuvor beschriebenen Verfahrensschritten hergestellt.

Zur Identifikation der IA-2-spezifischen monoklonalen Antikörper wird bevorzugt ein ELISA-Test durchgeführt. Für das Auffinden von anti-IA-2 spezifischen EBV-transformierten B-Zelllinien müssen je Spender mindestens 1000 Primärwells getestet werden. Ein solch umfangreiches Screening ist mit dem sehr arbeitsaufwendigen RIA des
5 Standes der Technik nicht möglich. Der sehr hohe Probendurchsatz ist nur durch Entwicklung eines ELISA zu erzielen. Mit diesem halbautomatischen ELISA ist es möglich, mehrere tausend Kulturüberstände pro Tag zu testen und damit das sehr seltene Ereignis eines IA-2-positiven Primärwells zu entdecken .

- 10 Im ELISA werden mit Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatten mit IA-2-Biotin oder IA-2ic-Biotin beschichtet. Anschließend werden die beschichteten Platten mit verschiedenen Verdünnungsstufen von Humanseren aus Prädiabetikern oder etablierten Diabetikern inkubiert. Parallel dazu werden auf derselben Mikrotiterplatte definierte Mengen eines gereinigten humanen IA-2-spezifischen Antikörpers inkubiert. Anschließend werden
15 die Platten gewaschen und zum Nachweis von gebundenen Anti-IA-2-Antikörpern ein Peroxidase-markiertes Schaf-anti-Human-Fcγ-spezifisches Antikörperkonjugat zugegeben. Gebundene IA-2-spezifische Antikörper werden durch eine Farbreaktion mittels ABTS® (Azino-di-[3-ethylbenzthiazolinsulfonat (6)], Kat. Nr. 756 407, Boehringer Mannheim GmbH Deutschland) nachgewiesen. Aus den Extinktionen der Standardkurve kann unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors auf den Gehalt der
20 Anti-IA-2-Antikörper in den Patientenseren geschlossen werden.

Zur Herstellung des Antigens IA-2ic, das im ELISA eingesetzt wird, wurde aus einer Inselzell-spezifischen cDNA das IA-2ic-Gen durch die folgenden Primer amplifiziert,
25 die von Payton et al. (1995) in J. Clin. Invest. 96, 1506-1511 publiziert sind:

5'-ATGCAGCAAGACAACGAGCGCCTG-3' und
5'-TCACTGGGGCAGGGCCTTGAG-3'

- 30 Die Amplifikationsprodukte wurden in einen Pin Point Vektor kloniert und in E. coli als lösliches, biotinyliertes Fusionsprotein exprimiert. Das Fusionsprotein wurde an

- monomerer Avidin-Sepharose aufgereinigt. Das biotinylierte IA-2ic wurde an mit Streptavidin beladene Mikrotiterplatten gebunden, mit den erfindungsgemäßen IA-2-spezifischen monoklonalen Antikörpern inkubiert und gebundener Antikörper durch ein mit Peroxidase markiertes Anti-Human-IgG-Konjugat nachgewiesen. Um auszuschließen, daß die Antikörper gegen die biotinylierte aminoterminal Domäne des Fusionsproteins gerichtet waren, wurde auch die biotinbindende Domäne des Fusionsproteins (Tag-Protein) alleine exprimiert und im ELISA getestet. Die IA-2-spezifischen Antikörper erkannten das Tag-Protein nicht. Zusätzlich wurden die IA-2-spezifischen Antikörper in einem RIA getestet. Hierzu wurde die DNA für IA-2ic in vitro in Anwesenheit von ^{35}S -Methionin transkribiert und translatiert, mit den IA-2-spezifischen Antikörpern inkubiert und die Immunkomplexe durch Zugabe von Protein A-Sepharose immobilisiert. Die Radioaktivität in den Immunpräzipitaten wurde durch Flüssigszintillationszählung bestimmt.
- Ebenfalls ein Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zum Nachweis von humanen Antikörpern oder Autoantikörpern gegen das Inselzellantigen IA-2 in einer Probe. Als Testformate kommen alle dem Fachmann geläufigen Formate in Frage, wobei der indirekte ELISA-Test bevorzugt ist. Als geeignet hat es sich erwiesen, aufgereinigtes natives oder rekombinant hergestelltes IA-2-Antigen oder IA-2ic-Antigen mit der Probe in Kontakt zu bringen, so daß die Probenantikörper an das Antigen spezifisch binden können. Ist das Antigen mit einer festphasenbindefähigen Gruppe versehen wie beispielsweise Biotin, so kann anschließend die Immobilisierung des Immunkomplexes an einer mit Streptavidin beschichteten Festphase erfolgen. Das Antigen kann auch bereits direkt oder indirekt an der Festphase gebunden sein, wenn die Inkubation mit der Probe stattfindet. Der Nachweis der Probenantikörper erfolgt nach Trennung der festen von der flüssigen Phase bevorzugt durch Bindung eines mit einer Markierung versehenen Antikörpers, der gegen den Fc-Teil von humanen Antikörpern, im allgemeinen den Fc-Teil von humanem IgG gerichtet ist, und anschließende Messung der Markierung. Als Markierung können alle dem Fachmann geläufigen Markierungen verwendet werden, wie beispielsweise Enzyme wie Peroxidase, Haptene wie Digoxi-

genin, Fluoreszenzfarbstoffe oder zur Elektrochemilumineszenz oder Chemilumineszenz fähige Substanzen.

Denkbar ist auch ein kompetitives Testformat, bei dem das IA-2- oder IA-2ic-Antigen
5 direkt oder indirekt an einer Festphase gebunden ist und ein erfindungsgemäßer humaner monoklonaler Antikörper gegen IA-2 oder IA-2ic, der eine Markierung trägt, in einer definierten Konzentration als Rezeptor zugesetzt und mit dem Antigen inkubiert wird. Wird die Probe gleichzeitig oder danach hinzugefügt, so kompetieren die Probenantikörper und der markierte Rezeptorantikörper miteinander um die Bindung an das
10 Antigen. Nach Trennung der festen von der flüssigen Phase wird die Markierung in einer oder beiden Phasen bestimmt. Ein geringes Signal der Markierung an der Festphase deutet auf eine hohe Konzentration an Probenantikörper hin.

Durch Vergleich der erhaltenen Meßwerte für die Proben mit Meßwerten, die mittels
15 einer Standardreihe zuvor ermittelt werden, kann eine Quantifizierung der Probenantikörper erfolgen. In einer solchen Standardreihe werden definierte Konzentrationen der erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper gegen IA-2 oder IA-2ic eingesetzt.

Als Proben für den Nachweis von Antikörpern gegen IA-2 können alle dem Fachmann
20 geläufigen Körperflüssigkeiten verwendet werden. Dazu zählen beispielsweise Vollblut, Serum oder Plasma, Urin und Speichel.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung eines humanen monoklonalen Antikörpers gegen IA-2 oder IA-2ic als Standard oder als Rezeptor in einem Verfahren zur Bestimmung von Antikörpern gegen ein Inselzellantigen, bevorzugt gegen das
25 Inselzellantigen IA-2.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung eines humanen monoklonalen Antikörpers gegen das Inselzellantigen IA-2 zur Gewinnung des Inselzellantigens
30 IA-2. Zur Gewinnung des Inselzellantigens IA-2 können die erfindungsgemäßen Antikörper nach dem Fachmann bekannten Verfahren an eine Festphase gekoppelt werden.

Anschließend wird die IA-2-haltige Probe mit den Festphasen-gebundenen Antikörpern inkubiert und die übrigen Bestandteile abgetrennt. Durch Spaltung des Immunkomplexes zwischen Antikörper und Antigen beispielsweise durch eine hohe Salzkonzentration und anschließender Elution kann das Antigen in reiner Form erhalten werden.

5

Gegenstand der Erfindung sind auch anti-idiotypische Antikörper, deren Antigenbindungsstelle der Struktur des Antigens IA-2 bzw. IA-2ic entspricht. Erhältlich ist ein solcher anti-idiotypischer Antikörper durch Immunisierung mit einem erfindungsgemäßen humanen Antikörper gegen IA-2, Immortalisierung der Milzzellen der immunisierten Tiere, Klonierung von solchen immortalisierten Zellen, die Antikörper produzieren, die an die Bindungsregion der IA-2 spezifischen Antikörper binden und Isolierung der von diesen Klonen produzierten Antikörper nach bekannten Verfahren.

Ebenfalls ein Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zum Nachweis von IA-2 in einer Probe, das dadurch gekennzeichnet ist, daß als Bindepartner mindestens ein erfindungsgemäßer monoklonaler Antikörper dazu eingesetzt wird. Bevorzugt wird der Nachweis als Sandwich-ELISA durchgeführt. Dabei wird als ein Bindepartner ein Antikörper gegen IA-2, der ein erfindungsgemäßer Antikörper sein kann, nach dem Fachmann bekannten Methoden (beispielsweise über Biotin/Streptavidin) an eine Festphase gebunden. Das in der Probe vorhandene IA-2 bindet an den festphasengebundenen Antikörper. Der Nachweis des gebundenen IA-2 erfolgt über einen weiteren Bindpartner, der eine Markierung trägt. Der weitere Bindepartner ist ebenfalls bevorzugt ein Antikörper und bindet ebenfalls spezifisch an IA-2, erkennt jedoch ein anderes Epitop als der festphasengebundene Bindepartner. Der markierte Bindepartner kann ein erfindungsgemäßer monoklonaler Antikörper sein, wenn der festphasengebundene Antikörper ein anderes Epitop erkennt. Als Markierung können alle dem Fachmann geläufigen Markierungen eingesetzt werden. Dazu zählen beispielsweise Enzyme wie Peroxidase, Haptene wie Digoxigenin, Fluoreszenzfarbstoffe, zur Elektro- oder Chemilumineszenz fähige Substanzen.

30

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung weiter.

Beispiel 1:**Auswahl der Spender für die Isolierung von B-Lymphozyten**

- 5 Um die Wahrscheinlichkeit für eine erfolgreiche Transformation von anti-IA-2-spezifischen B-Lymphozyten aus dem peripheren Blut zu erhöhen, wurden für die Lymphozyten-Isolierung Spender ausgewählt, die einen hohen Serum-Antikörper Titer gegen IA-2 aufwiesen.
- 10 Die Antikörper wurden dabei durch einen in vitro Translationsassay bestimmt (siehe Zhang et al 1997, Diabetes 46, 40-43 sowie Dittler J. et al 1998, Diabetes 47, 592-597). Frisch diagnostizierten Diabetikern wurde Blut entnommen und nach bekanntem Verfahren Serum gewonnen. Ein Volumen von 2 – 5 µl der einzelnen Seren wurde in 50 µl Präzipitationspuffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,1% Aprotinin) mit dem durch in vitro Translation radioaktiv markierten IA-2ic Polypeptid (ca. 15 000 cpm) über Nacht bei 4°C unter Rotation inkubiert. Anschließend wurden 50 µl einer 50%igen Protein A Sepharose-Suspension zugegeben und für eine weitere Stunde inkubiert. Danach wurde dreimal mit dem Inkubationspuffer gewaschen und die Radioaktivität der Beads in einem Flüssigszintillationsgerät bestimmt. Als arbiträrer
- 20 Standard wurde ein hochtitriges Diabetiker-Serum verwendet, welches bei einer Serummenge von 5 µl ca. 1000 cpm im Immunpräzipitat aufwies. Dieser Wert wurde als gleichbedeutend mit 100 U definiert. Die Normalseren lagen damit bei ca. 5 U. Für die nachfolgenden Transformationen der peripheren Blutlymphozyten wurden nur Lymphozyten von Patienten verwendet, deren Seren einen Titer von größer als 80 U
- 25 aufwiesen.

Beispiel 2:**Zellseparation und EBV-Transformation**

- 5 Nur solche Lymphozytenspender, deren Seren mindestens einen Titer von 80 U aufwiesen, wurden für die Isolierung von B-Lymphozyten verwendet. Von diesen Spendern wurden 20-50 ml Blut abgenommen und daraus die peripheren mononukleären Zellen (PBMNC) über eine Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert.
- 10 Die klassischen Tests zum Nachweis der IA-2-spezifischen Serum-Antikörper werden zur Abtrennung der Immunkomplexe Protein A-Sepharose. Deshalb muß angenommen werden, daß die anti-IA-2 Antikörper fast ausschließlich der IgG-Immunglobulin-klasse angehören (Zhang et al, Diabetes, 1997, 46, 40-43 sowie Dittler J. et al, Diabetes, 1998, 47, 592-597). Da die B-Lymphozyten des peripheren Blutes jedoch überwiegend
- 15 IgM produzieren, wurden zur Anreicherung der relevanten B-Zell Subpopulation die Membran-IgG positiven B-Zellen isoliert. Hierzu wurden die PBMNC mit eiskaltem IMDM/10% fötalem Kälberserum (IMDM/10% FKS) auf eine Konzentration von $3 \cdot 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Anschließend wurde ein Anti-Human-IgG-Antikörper aus der Maus in einer Konzentration von 10 µg/ml zugegeben. Die Zellen wurden dann 30
- 20 Minuten bei 4°C gerollert, um ein Absetzen der Zellen während der Inkubation zu vermeiden. Anschließend wurde bei 200*g für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen zweimal mit IMDM/10% FKS gewaschen.
- 25 Danach wurden die Zellen in IMDM/10% FKS in einer Konzentration von $1 \cdot 10^7$ Zellen/ml (Gesamtzellzahl ca. $1 \cdot 10^7$ Zellen) aufgenommen und mit Magnetobeads (Dynal M-280), die mit Schaf-Anti-Maus-IgG beladen waren, inkubiert. Es wurden etwa 10 Beads pro Zielzelle zugegeben (es wurde davon ausgegangen, daß etwa 5% der PBMNC Membran-IgG exprimieren).

30

Die Zellen wurden mit den Beads für 30 Minuten bei 4°C gerollert. Danach wurde das Reaktionsgefäß für 5 Minuten in den Magnethalter gestellt, um die markierten Zellen abzutrennen. Der Überstand wurde abgesaugt, die Beads in 1 ml Medium resuspendiert und nochmals für 5 Minuten in den Magnethalter gestellt. Der Überstand wurde erneut abgesaugt, das Röhrchen aus dem Magnethalter genommen und die isolierten Zellen in 0,5 ml IMDM/10% FKS resuspendiert.

- Anschließend wurden 2 ml konzentrierte Epstein-Barr-Virus-Suspension zugeben. Die Virussuspension wurde aus dem Überstand einer konfluenten Kultur der B 95-8 Marmoset Zelllinie (ATCC CRL 1612) gewonnen. Zur Virusadsorption wurden die B-Zellen für 2 Stunden im Brutschrank bei 37 °C, 7 % CO₂ inkubiert. Das Röhrchen wurde während der Inkubationsphase mehrmals bewegt, um ein Absetzen der Zellen zu vermeiden.
- 15 Danach wurde mit den separierten B-Zellen eine Verdünnungsreihe gemacht, sodaß 100, 200 und 400 B-Zellen in 100 µl IMDM/10% FKS enthalten waren. Diese Zellsuspensionen wurde dann mit 4000 rad bestrahlten allogenen PBMNC (ohne CD8-positive Zellen) als Feederzellen versetzt (50 000 Feederzellen pro 150 µl Zellsuspension). Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 U/ml IL-6. Pro Well wurden 150 µl
- 20 Zellsuspension in 96 Well Rundbodenplatten verteilt und für 2 Wochen bei 5% CO₂ und 37°C inkubiert. Nach 7-10 Tagen wurde das Medium gewechselt.

Beispiel 3:**Screening-Assay für IA-2-Antikörper produzierende EBV-transformierte B-Zell-Linien**

5

Nach zwei Wochen wurden die Kulturüberstände der EBV-Linien in einem ELISA auf Reaktivität gegen rekombinantes IA-2 getestet. Als Antigen wurde der intrazelluläre Teil des IA-2 (IA-2ic) in Escherichia coli in Kombination mit einem Biotin-markierten Peptid am NH₂-Terminus exprimiert. Das Fusionsprotein wurde durch Affinitätschromatographie an einer Streptavidin-Säule aufgereinigt.

10

Mit Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatten wurden mit IA-2ic-Biotin in einer Konzentration von 100 ng/ml für eine Stunde bei Raumtemperatur beschichtet. Anschließend wurden die Platten mit 0,15 mol/l NaCl/0,05 % Tween 20 gewaschen. In die

15 Platten wurden 50 µl RPMI/10%FKS vorgelegt und danach 50 µl Kulturüberstand der EBV-transformierten B-Zellen zugegeben. Es wurde 1 Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Platten gewaschen und zum Nachweis von gebundenen Anti-IA-2-Antikörpern 100 µl eines Peroxidase-markierten Schaf-Anti-Human-Fcγ-Antikörpers (Boehringer Mannheim GmbH, Kat. Nr. 1089 196, 100

20 mU/ml in PBS/0,5% Rinderserumalbumin) zugegeben. Anschließend wurde wiederum für 1 Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Überschüssiges Konjugat wurde durch dreimaliges Waschen mit 0,15 mol/l NaCl/0,05 % Tween 20 entfernt. Danach wurden 100 µl ABTS® (1 mg/ml, Boehringer Mannheim GmbH, Kat. Nr. 756 407) in 40 mmol/l Citrat-Puffer pH 4,4, der 3,25 mmol/l Natriumperborat enthält, zu-

25 gegeben und nach 45 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur unter Schütteln die Extinktion bei 405 nm gemessen.

Bei einem typischen Transformationsansatz wurden aus anfänglich $1 \cdot 10^7$ PBMNC $2 \cdot 10^5$ Membran-IgG positive B-Zellen isoliert. Diese wurden auf ca. 1000 Näpfe verteilt.

30 Die Zahl der im Screeningtest als positiv identifizierten Näpfe lag im Bereich zwischen 1-

3 Nöpfe pro 1000 getesteter Nöpfe. Die Extinktion der positiven Nöpfe lag im Bereich von 1500-2000 mE.

5

Beispiel 4:**Klonierung der EBV-transformierten B-Zell Linien**

- 10 Diejenigen EBV-transformierten B-Zell Linien, deren Kulturüberstand eine positive Reaktion im ELISA ergab, wurden kloniert. Die Zellen wurden dazu mit Hilfe eines Fluoreszenz-aktivierten Zellsorters einzeln in 96er Mikrotiterplatten abgelegt und mit bestrahlten CD8-depletierten PBMNC ($5 \cdot 10^4$ Zellen/Vertiefung, 4000 rad) versetzt. Das Klonierungsmedium bestand aus IMDM/10%FKS/100 U/ml IL-6. Die Kulturüberstände
- 15 mit wachsenden Klonen wurden mittels ELISA getestet und die positiven Klone expandiert. Die Massenkultur zur Isolierung von Antikörpern erfolgte in einem Tecomaus-Bioreaktor. Die Antikörper wurden aus dem Überstand durch Ammoniumsulfatfällung und Chromatographie über Protein A- oder Protein-G-Sepharose isoliert.

20

Patentansprüche

1. Humane monoklonale Antikörper, die spezifisch mit dem Inselzellantigen IA-2 reagieren.
- 5 2. Humane monoklonale Antikörper gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie spezifisch mit IA-2ic, dem cytoplasmatischen Teil von IA-2 reagieren.
3. Humane monoklonale Antikörper nach Anspruch 1 oder 2, erhältlich durch die
10 Verfahrensschritte Immortalisieren von humanen Lymphozyten von Prädiabetikern oder Diabetikern mit hohen Serumantikörper-Titern gegen IA-2, Kultivierung der immortalisierten Lymphozyten mit Wachstumsfaktoren unter gleichzeitiger Entfernung von inhibitorischen Faktoren, Nachweis der IA-2-spezifischen humanen monoklonalen Antikörper im Kulturüberstand, Klonierung der humanen immorta-
15 lisierten Zelllinie, die diesen Antikörper produziert, in Anwesenheit von Feederzellen, die keine cytotoxischen T-Lymphozyten enthalten, Vermehrung dieser immortalisierten Zelle gegebenenfalls unter Zusatz von Wachstumsfaktoren und Isolierung des von diesem Klon produzierten monoklonalen Antikörpers.
- 20 4. Humane monoklonale Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie der Klasse IgG angehören.
5. Humane monoklonale Antikörper nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie der Subklasse IgG1 angehören.
- 25 6. Humane monoklonale Antikörper nach den Ansprüchen 1 bis 5, erhältlich aus der Zelllinie IA-2, 96-3-1 mit der Hinterlegungsnummer DSM ACC2365.
7. Humane monoklonale Antikörper nach den Ansprüchen 1 bis 6, die in äquivalenter
30 Weise mit IA-2 bindefähig sind wie die Antikörper, die von der Zelllinie IA-2, 96-3-1, Hinterlegungsnummer DSM ACC2365, produziert werden.

8. Zelllinie IA-2, 96-3-1 mit der Hinterlegungsnummer DSM ACC2365.
9. Verfahren zur Herstellung von humanen monoklonalen Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 7 enthaltend die Schritte Immortalisieren von humanen Lymphozyten von Prädiabetikern oder Diabetikern mit hohen Serumantikörper-Titern gegen IA-2, Kultivierung der immortalisierten Lymphozyten mit Wachstumsfaktoren unter gleichzeitiger Entfernung von inhibitorischen Faktoren, Nachweis der IA-2-spezifischen humanen monoklonalen Antikörper im Kulturüberstand, Klonierung der humanen immortalisierten Zelllinie, die diesen Antikörper produziert, in Anwesenheit von Feederzellen, die keine cytotoxischen T-Lymphozyten enthalten, Vermehrung dieser immortalisierten Zelle gegebenenfalls unter Zusatz von Wachstumsfaktoren, und Isolierung des von diesem Klon produzierten monoklonalen Antikörpers.
10. Verwendung eines humanen monoklonalen Antikörpers nach einem der Ansprüche 1 bis 7 als Standard in einem Verfahren zur Bestimmung von Antikörpern gegen ein Inselzellantigen.
11. Verwendung eines humanen monoklonalen Antikörpers nach einem der Ansprüche 1 bis 7 als Rezeptor in einem Verfahren zur Bestimmung von Antikörpern gegen ein Inselzellantigen.
12. Verwendung eines humanen monoklonalen Antikörpers nach einem der Ansprüche 1 bis 7 zur Gewinnung des Inselzellantigens IA-2.
13. Verfahren zum Nachweis von Antikörpern gegen das Inselzellantigen IA-2 in einer Probe, dadurch gekennzeichnet, daß als Standard ein monoklonaler Antikörper gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 eingesetzt wird.
14. Anti-idiotypischer Antikörper, der gegen Antikörper, die mit dem Inselzellantigen IA-2 reagieren, gerichtet ist, erhältlich durch die Immunisierung mit einem Anti-

körper gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, Immortalisierung der Milzzellen der immunisierten Tiere, Klonierung von solchen immortalisierten Zellen, die Antikörper produzieren, die an Antikörper gegen IA-2 binden und Isolierung der von diesen Klonen produzierten Antikörper nach bekannten Verfahren.

5

15. Verfahren zum Nachweis des Inselzellantigens IA-2 in einer Probe, dadurch gekennzeichnet, daß als Bindepartner mindestens ein monoklonaler Antikörper gemäß den Ansprüchen 1 bis 7 eingesetzt wird.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Appl. No.

PCT/EP 99/06321

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K16/18 C12N5/10 G01N33/577 G01N33/68 C07K16/42

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 499 176 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 19 August 1992 (1992-08-19) cited in the application the whole document — —/—	1-15

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 November 1999

Date of mailing of the international search report

03/12/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Nooij, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 99/06321

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>M. SOLIMENA ET AL.: "ICA 512, an autoantigen of type I diabetes, is an intrinsic membrane protein of neurosecretory granules." THE EMBO JOURNAL, vol. 15, no. 9, 1 May 1996 (1996-05-01), pages 2102-2114, XP002123338 Oxford, Grossbritannien cited in the application abstract page 2102, right-hand column, line 41 - line 53 page 2103, left-hand column, line 38 - line 41 page 2106, right-hand column, line 24 - line 29 Material and methods - Antibodies</p>	1-15
A	<p>A. MADEC ET AL.: "Four IgG anti-islet human monoclonal antibodies isolated from a type 1 diabetes patient recognize distinct epitopes of glutamic acid decarboxylase 65 and are somatically mutated." THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 156, no. 9, 1 May 1996 (1996-05-01), pages 3541-3549, XP002123339 Baltimore, MD, VSA cited in the application abstract page 3541, right-hand column, line 26 -page 3542, left-hand column, line 14</p>	1-15
A	<p>M. PAYTON ET AL.: "Relationship of the 37,000- and 40,000-Mr tryptic fragments of islet antigens in insulin-dependent diabetes to the protein tyrosine phosphatase-like molecule IA-2." THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 96, 1 September 1995 (1995-09-01), pages 1506-1511, XP000612574 New York, NY, VSA cited in the application</p>	1-15
A	<p>US 5 200 318 A (RABIN ET AL.) 6 April 1993 (1993-04-06) claims</p>	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. l. Application No

PCT/EP 99/06321

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 499176	A	19-08-1992	DE 4129849 A	27-08-1992
			AT 161581 T	15-01-1992
			DE 59209079 D	05-02-1998
			ES 2112869 T	16-04-1998
			JP 2085501 C	23-08-1996
			JP 5115296 A	14-05-1993
			JP 7116239 B	13-12-1995
			US 5888813 A	30-03-1999
US 5200318	A	06-04-1993	AU 3854393 A	18-11-1993
			CA 2095278 A	14-11-1993
			EP 0569800 A	18-11-1993
			JP 6034629 A	10-02-1994

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. Nationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/06321

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C07K16/18 C12N5/10 G01N33/577 G01N33/68 C07K16/42

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationsymbole)

IPK 7 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 499 176 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 19. August 1992 (1992-08-19) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument — -/-	1-15

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

19. November 1999

Abschließdatum des internationalen Recherchenberichts

03/12/1999

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 6818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3018

Bevollmächtigter Beauftragter

Nooij, F

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>M. SOLIMENA ET AL.: "ICA 512, an autoantigen of type I diabetes, is an intrinsic membrane protein of neurosecretory granules." THE EMBO JOURNAL, Bd. 15, Nr. 9, 1. Mai 1996 (1996-05-01), Seiten 2102-2114, XP002123338 Oxford, Grossbritannien in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Seite 2102, rechte Spalte, Zeile 41 - Zeile 53 Seite 2103, linke Spalte, Zeile 38 - Zeile 41 Seite 2106, rechte Spalte, Zeile 24 - Zeile 29 Material and methods - Antibodies</p>	1-15
A	<p>A. MADEC ET AL.: "Four IgG anti-islet human monoclonal antibodies isolated from a type 1 diabetes patient recognize distinct epitopes of glutamic acid decarboxylase 65 and are somatically mutated." THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, Bd. 156, Nr. 9, 1. Mai 1996 (1996-05-01), Seiten 3541-3549, XP002123339 Baltimore, MD, VSA in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Seite 3541, rechte Spalte, Zeile 26 -Seite 3542, linke Spalte, Zeile 14</p>	1-15
A	<p>M. PAYTON ET AL.: "Relationship of the 37,000- and 40,000-Mr tryptic fragments of islet antigens in insulin-dependent diabetes to the protein tyrosine phosphatase-like molecule IA-2." THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, Bd. 96, 1. September 1995 (1995-09-01), Seiten 1506-1511, XP000612574 New York, NY, VSA in der Anmeldung erwähnt</p>	1-15
A	<p>US 5 200 318 A (RABIN ET AL.) 6. April 1993 (1993-04-06) Ansprüche</p>	1-15

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/06321

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 499176 A	19-08-1992	DE 4129849 A	27-08-1992
		AT 161581 T	15-01-1992
		DE 59209079 D	05-02-1998
		ES 2112869 T	16-04-1998
		JP 2085501 C	23-08-1996
		JP 5115296 A	14-05-1993
		JP 7116239 B	13-12-1995
		US 5888813 A	30-03-1999
US 5200318 A	06-04-1993	AU 3854393 A	18-11-1993
		CA 2095278 A	14-11-1993
		EP 0569800 A	18-11-1993
		JP 6034629 A	10-02-1994